

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 昭62-115280

⑬ Int. Cl.⁴ 識別記号 庁内整理番号 ⑭ 公開 昭和62年(1987)5月26日
 C 12 N 9/02 7236-4B
 A 61 K 37/50 7138-4C
 C 07 K 13/00 8318-4H
 //(C 12 N 9/02
 C 12 R 1:425) 審査請求 未請求 発明の数 3 (全7頁)

⑮ 発明の名称 修飾酵素、その製造法およびその用途

⑯ 特 願 昭61-149112

⑰ 出 願 昭61(1986)6月24日

優先権主張 ⑱ 昭60(1985)7月5日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 昭60-148922

㉑ 発 明 者 宮 田 孝 一 川西市清和台西1丁目6番地の77
 ㉒ 発 明 者 中 川 康 川西市緑台5丁目1番7号
 ㉓ 発 明 者 中 村 昌 平 奈良県北葛城郡香芝町北今市408番地
 ㉔ 出 願 人 武田薬品工業株式会社 大阪市東区道修町2丁目27番地
 ㉕ 代 理 人 弁理士 岩 田 弘

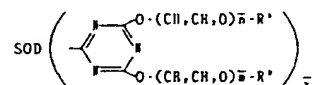
明 細 書

1. 発明の名称

修飾酵素、その製造法およびその用途

2. 特許請求の範囲

(1) 式



[式中、SODはセラチア菌属が産生するマンガン型スーパーオキシドディスムターゼを、 $\overline{\text{n}}$ および $\overline{\text{m}}$ は同一または異なって約7ないし100を、 R' および R'' は同一または異なって水酸基の保護基を、 $\overline{\text{n}}$ は約1ないし30をそれぞれ示す。]で表わされる修飾酵素。

(2) $\overline{\text{n}}$ と $\overline{\text{m}}$ が同一である特許請求の範囲第1項記載の酵素。

(3) $\overline{\text{n}}$ および $\overline{\text{m}}$ はそれぞれ約7ないし250である特許請求の範囲第1項記載の酵素。

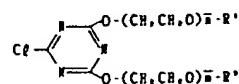
(4) R' と R'' が同一である特許請求の範囲第1

項記載の酵素。

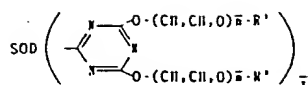
(5) R' および R'' はそれぞれ炭素数1ないし3のアルキルである特許請求の範囲第1項記載の酵素。

(6) セラチア・マルセッセンスATCC21074株で産生したSODである特許請求の範囲第1項記載の酵素。

(7) セラチア菌属が産生するマンガン型スーパーオキシドディスムターゼと式

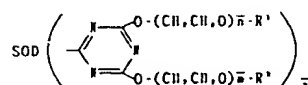


[式中、 $\overline{\text{n}}$ および $\overline{\text{m}}$ は同一または異なって約7ないし700を、 R' および R'' は同一または異なって水酸基の保護基を示す]で表わされる化合物とを反応させることを特徴とする式



[式中、 \bar{n} 、 \bar{m} 、 R' および R'' は前記と同意義を、SODはセラチア菌が産生するマンガン型スーパーオキシドディスムターゼを、 i は約1ないし30を示す]で表わされる修飾酵素の製造法。

(8) 式



[式中、SODはセラチア菌が産生するマンガン型スーパーオキシドディスムターゼを、 \bar{n} および \bar{m} は同一または異なって約7ないし700を、 R' および R'' は同一または異なって水酸基の保護基を、 i は約1ないし30をそれぞれ示す。]で表わされる修飾酵素および薬理的に許容される担体、賦形剤もしくは希釈剤を含有してなる消炎剤。

- 1 -

が得られるが、血中半減期が短いという欠点がある。また、微生物起源の酵素であるSODは、哺乳動物に投与すると、異種蛋白としての免疫原性が考えられる。

問題点を解決するための手段

上記した欠点を改良するため、SODに対し種々の化学修飾を試みた結果、ポリエチレングリコール(以下、PEGと略称することもある。)を結合せしめればきわめて有利な特徴を有することが判明した。ポリエチレングリコールを蛋白へ修飾するには種々の方法があるが、2本筋のポリエチレングリコールをトリアジンを介してSODのN-末端アミノ酸あるいはリジン残基のアミノ基と共有結合せしめる方法が最も反応生成物中の副産物が少なくかつ反応収率も良いことを見出した。

本発明者は、これらの知見に基づいてさらに鋭意研究した結果、本発明を完成した。

本発明は、(1) 式

(9) 経口投与用に錠剤またはカプセルに成型した特許請求の範囲第8項記載の消炎剤。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、消炎剤などとして用いることのできるセラチア菌が産生するマンガン型スーパーオキシドディスムターゼ(以下、SODと略称することもある。)の修飾酵素、その製造法およびその用途に関する。

従来の技術

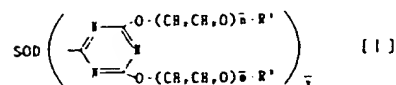
セラチア菌が産生するマンガン型スーパーオキシドディスムターゼは、日本特開昭57-29285号公報、日本特開昭58-16685号公報により知られている。

アスパラギナーゼをポリエチレングリコールで修飾することが報告されている[ケミストリー・レターズ(Chemistry Letters)第773~776頁(1980年)参照。]。

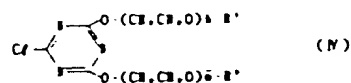
発明が解決しようとする問題点

SODはそれ自体の投与によっても抗炎症効果

- 4 -



[式中、SODはセラチア菌が産生するマンガン型スーパーオキシドディスムターゼを、 \bar{n} および \bar{m} は同一または異なって約7ないし700を、 R' および R'' は同一または異なって水酸基の保護基を、 i は約1ないし30をそれぞれ示す。]で表わされる修飾酵素、(2)セラチア菌が産生するマンガン型スーパーオキシドディスムターゼと式



[式中、 \bar{n} 、 \bar{m} 、 R' および R'' は前記と同意義を示す]で表わされる化合物とを反応させることを特徴とする修飾酵素(1)の製造法および(3)修飾酵素(1)を含有してなる消炎剤を提供するものである。

本発明で用いられるセラチア菌が産生するマ

ンガン型スーパーオキシドディスムターゼとしては、たとえば日本特開昭57-29285号公報、日本特開昭58-16685号公報に記載の方法で得られたものが挙げられる。

上記式中、 \bar{n} 、 \bar{m} および \bar{r} は、それぞれの平均値を示す。 \bar{n} および \bar{m} は、同一または異なって、好ましくは \bar{n} と \bar{m} が同一であって、約7ないし700を示し、好ましくは約7ないし250を、さらに好ましくは約30ないし150を示す。 \bar{r} は、約1ないし30を示し、さらに好ましくは約5ないし15を示す。

本発明で用いられるポリエチレングリコールとしては、平均分子量約300ないし3万のものが好ましい。なかでも、平均分子量約1000ないし1万のものがさらに好ましい。

上記式中、 R' および R'' で示される水酸基の保護基としては、たとえば炭素数1~3のアルキル基(例、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルなど)などが挙げられ、とりわけメチルが好ましい。

-7-

物[III]とを反応させ、化合物[N]を得るには、無水条件下で行うのがよく、ベンゼンあるいはトルエン中で約50°~80°で約15~50時間反応させる。

化合物[II]および[II']の混合物は、化合物[III]1モルに対し、化合物[II]および[II']の合計量が2モルとなる量を反応させるのが好ましい。反応後、反応液にたとえば石油エーテルを加え、化合物[N]を沈澱させ回収する。場合によってはたとえば有機溶媒(例、クロロホルム、アセトニトリル、ベンゼン、トルエンなど)を用いたゲルろ過も併用することができる。

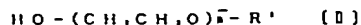
化合物[N]とSODとを反応させ、化合物[I]を得るには、水溶液中で、酵素の失活を防ぐため、たとえば室温以下で、pH 約8~10、約2~24時間反応させる。反応後、化合物[I]を得るため、たとえば水溶液でのゲルろ過及び陰イオン交換樹脂を用いた反応の化合物[N]を分離除去する。

このようにして、PEGで修飾されたSODである化合物[I](以下、PEG-SODと称することもある。)が得られる。

-8-

SODをPEGで修飾するには、SODをトリアジンを介して修飾するのが好ましい。

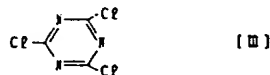
該修飾する方法としては、一般式



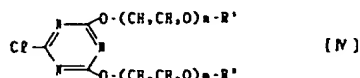
[式中、 \bar{n} および R' は前記と同意義を有する。]で表わされるPEGおよび一般式



[式中、 \bar{m} および R'' は前記と同意義を有する。]で表わされるPEGとの混合物と、式



で表わされる化合物とを反応させ、一般式



[式中、 \bar{n} 、 \bar{m} 、 R' および R'' は前記と同意義を有する。]で表わされる化合物を得、次いでこれにSODを反応させることにより行なわれる。

化合物[II]および化合物[II']の混合物と化合

-9-

本発明の化合物[I]は、充分なSOD活性を有する。また化合物[I]について、抗炎剤としての評価モデルとして、カラゲニン腫瘍法、オパールブミンでの遅延型(N)型アレルギー反応、異形腎炎法、放射線障害法などの実験をおこなったところ、PEGで修飾することにより、もとのSODよりもその効果が優れていることが認められた。

化合物[I]は、原SODに比し、次の優れた作用および性質を有する。

- (1) 増大された炎症作用を有する。
- (2) 免疫原性がほとんど認められない。
- (3) 血中半減期は長い。
- (4) 1回の注射投与により、免疫寛容が生じる。
- (5) 十二指腸から吸収され、SOD活性の血中濃度が高い。

また、化合物[I]の毒性は低い。

このように、化合物[I]は、優れた作用および性質を有し、しかも毒性が低いので、抗炎剤として有利に用いることができる。

本発明の化合物[I]を抗炎剤として用いるに

-10-

は、たとえば哺乳動物(豚、マウス、ラット、ウサギ、ネコ、犬、サル、人)の各種急性もしくは亜急性の炎症(胃、腸、肺、関節炎、気管支炎、打撲による浮腫、火傷、放射線照射炎症)の治療を目的として、経口的にまたは非経口的に投与する。

投与するにあたっては、化合物(1)を、薬理的に許容し得る担体、賦形剤、希釈剤などと混合し、自他公知の方法で、経口剤としてたとえば錠剤、カプセル剤として、非経口剤としてたとえば注射剤として、上記哺乳動物に投与する。

化合物(1)の1日投与量は、化合物(1)中の糖基量として約0.1~100mg/kg、さらに好ましくは約0.5~50mg/kgとなる化合物(1)の量である。

実施例

以下に実施例、参考例および実験例を挙げて、本発明をさらに具体的に説明する。

実施例1 PEG-SODの製造

モノメトキシポリエチレングリコール(平均分子量5000)40gをベンゼン200ml、無水炭酸ソーダ20g、モレキュラーシープ3A(和光純薬工業株式会社

社製)10gからなる混合液に塩化シアマル730mgを加え80℃、20時間攪拌しながら反応させた。反応後、石油エーテル400mlを加え、活性化PEGを沈殿せしめ、その沈殿物をベンゼンに溶解し、未反応の塩化シアマルを除去するためこの操作を3回くり返したのち、その沈殿物(活性化PEG)をデシケーター中で減圧下で乾燥させた。

セラチア・マルセッセンスATCC 21074を用いて日本特開昭58-18685号公報に記載の方法で得られたSOD 15mgに対し300倍のモル比になるように、上記で得られた活性化PEG 1.5gを加え、0.1Mホウ酸バッファー、pH 9.0の5.0ml中で4℃、2時間反応させたのち、0.1Mリン酸バッファー、pH 7.0を30ml加え反応を停止させ、限外ろ過(アミコン社製(米国)膜YM-10)で未反応のPEGを除去し、蒸留液2.0mlをセファクリルS-200(ファルマシア社製、スウェーデン)のカラム(5×73cm)のゲルろ過によって精製し、PEG-SODとして約15mgを得た。得られたPEG-SODは、SODの7~12残基のアミノ基が修飾されており、SOD活性

SOD (15mg) 1
PEG (1500mg) 30

$$\frac{15}{15} : \frac{1500}{1500} = 1:300$$

M=15000
(SOD 5000と見)

-11-

はもとの約50%程度になった。紫外線吸収曲線は280nmでは5%以内の増加であるが、それよりも短波長ではトリアジン核に基づく吸収がみとめられた。

実施例2 PEG-SODの製造

実施例1と同様にして、分子量の異なるモノメトキシポリエチレングリコール(平均分子量350、750または1900)を用い、それぞれの活性化PEGを調製し、これらをそれぞれ実施例1で用いたのと同様のSODに対し300倍のモル比になるようにSODと反応させ、実施例1と同様の方法でそれぞれのPEG-SODを調製した。これらの結果を表1に示す。

表 1

	比活性(Units/mg蛋白)	アミノ基修飾率
SOD(対照)	100%	0%
PEG(350)-SOD	39%	48%
PEG(750)-SOD	41%	48%
PEG(1900)-SOD	41%	48%

注: PEGの量の()内は使用したPEGの平均分子量

を示す。

参考例1 デキストラン-SODの調製

デキストラン(平均分子量6~9万)1gを50mlの蒸留水に溶解し、シアンプロミド約0.3gを加え、5M NaOHを加えることにより、pHを10.5に維持しつつ、20℃で30分間反応させた。ついでNaHCO₃でpHを9.0に修正したのち、実施例1で用いたのと同様のSOD(114mg/13ml蒸留水)を加え、引き続き4℃で20時間反応させた。反応液を限外ろ過(YM-10を用いる。)で3mlに濃縮し、セファクリルS-200(5×73cm)のカラムでゲルろ過をすることにより未反応のSODを除去し、デキストラン-SOD約0.7gを得た。得られたデキストラン-SODは、SODのアミノ基の34%が修飾され、酵素活性は67%残存していた。

実験例1 抗炎症作用

抗炎症作用の一評価方法としてカラゲニン腫瘍法をおこなった。すなわち、日本薬理学会誌、81、331(1984)に記載の方法にしたがって、ラットの背部の皮下に2%(v/v)のカラゲニン溶液を注入

し、その30分後に表2に記載の酵素を静脈内投与し、24時間後の腫瘍を切り出しその重量を測定し、対照(生理食塩水投与)と比較した。

なお、本実験例および以下の実験例において、SODは、実施例1で用いたのと同様のものを、デキストラン-SODは前記参考例1で得られたものをそれぞれ用いた。

表2 抗炎症作用(カラゲニン・腫瘍法)

	1) 投与量	2) 使用数	3) 腫瘍重量	4) 阻害率
対 照	-	10匹	2.117±0.11g	-
SOD	2mg/kg	10匹	2.065±0.13g	2.5%
デキストラン-SOD	2mg/kg	10匹	1.694±0.12g	20.0%
PEG-SOD ⁴⁾	2mg/kg	10匹	1.701±0.11g	19.7%

注:1) いずれもSOD活性として同一単位量を投与した。

2) 平均値±標準偏差

3) $P < 0.05$ (Student T test法)

4) 実施例1で得られたPEG-SODを使用した。

表2に示すごとく、標準酵素であるデキストラ

-15-

塩で表示した。

表3 免疫原性試験

	使用数	7月11日	PCA-titer 14日11日 21日11日	28月11日	35月11日
SOD	8匹	8	32	256	256
デキストラン-SOD	8匹	0	256	128	128
PEG-SOD ¹⁾	8匹	0	0	0	0

1) PEG-SODは、実施例1で得られたものを用いた。

表3に示すごとく、原SOD及びデキストラン-SODはSODに対する抗体産生が認められたのに対し、PEG-SOD投与群ではSODに対する抗体産生は全く認められなかった。また、同様におこなったPEG-SODに対する抗体の産生も全く認められなかった。

実験例3 血中半減期

各酵素(SODとして5mg/kg)をラット(各3匹)に静脈内注射(1ml)し、経時的に尾静脈から採血し、その血漿中のSOD活性を測定し、その1次反応定数から半減期を求めた。

-17-

ン-SOD及びPEG-SODは原SODに比べて抗炎症作用が増強され、対照群(生理食塩水投与)に比べて統計的に有意の差が認められた。

実験例2 免疫原性

ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ(Journal of Immunological Methods)11, 381(1977)に記載の方法にしたがっておこなった。各酵素(SODとして20μg)をフロイント完全補助液(Freund's complete adjuvant)(FCA)で乳化化したのちA/Jマウスの腹腔内へ投与(0.2ml)し、その後さらに、14日目、28日目に追加投与をおこなった。最初の投与日から7日目毎にマウス腹腔静脈から採血し、その血清について、ラットを用いて、予め希釈しておいた血清を皮内注射(0.1ml)をしておき、その4時間後にSOD 0.5mgとエバンスブルー20mgの混液2mlを静脈注射し、色素の血管透過性をもって判定する受身皮膚アナフィラキシー(Passive Anaphylaxis, PCA)反応による抗体産生の評価をおこなった。結果を表3に示した。表中の数値はPCA反応が陽性であった血清の最大希釈

-16-

表4 血中半減期

SOD	1.4時間
PEG-SOD ¹⁾	14.2時間

注:1) 実施例1で得られたPEG-SODを用いた。

表4に示すごとく、PEG-SODは原SODよりも約10倍血中半減期が長くなった。

実験例4 血中半減期

実験例3と同様の方法で、SODおよび実施例1および2で得られたPEG-SODについての血中半減期を求めた。結果を表5に示す。

表5 血中半減期

	1) 血中半減期
SOD	1.4時間
PEG(350)-SOD ²⁾	6.3時間
PEG(150)-SOD ²⁾	8.7時間
PEG(1900)-SOD ²⁾	11.2時間

注:1) 実験例3と同様の方法で求めた。

2) 実施例2で得られたPEG-SODを使用した。

表5に示すごとく、いずれの分子量のPEGを

-18-

用いたSODの溶解酵素も、血中半減期は原SODのそれよりも長くなった。

実験例5 免疫原性

実施例2で得られたPEG-SODの免疫原性を実験例2と同様の方法で行ない、その結果を表6に示した。

表6 免疫原性試験

	使用 数	PCA-titer 7日 14日 21日 28日 35日				
		7日目	14日目	21日目	28日目	35日目
SOD	8匹	4	128	128	512	512
PEG(350)-SOD ¹⁾	8匹	0	8	32	256	256
PEG(750)-SOD ¹⁾	8匹	0	4	16	32	32
PEG(1900)-SOD ¹⁾	8匹	0	0	0	0	0

注:1) 実施例2で得られたPEG-SODを使用した。

表6から明らかな如く、SODをPEGで修飾することによりその抗体産生が減少し、PEG(1900)-SODでは全く抗体産生が認められなかった。

実験例6 免疫寛容誘導

で、生理食塩水をA/Jマウス(一群8匹)に静脈注射し、1、3および5週間後にSOD20 μ gとFCAとの乳化物を腹腔内投与した際のSODに対するIgE抗体の産生パターンを示す。

上記の結果から明らかな如く、PEG-SODは、原SODよりも強く免疫寛容を誘導した。

実験例7 十二指腸投与後の血漿中のSOD活性

実施例1で得たPEG-SODおよびSODをそれぞれSOD活性として100ng/kgを、カンヌーレを用いて20時間絶食したラット(雄性、Jcl:スプラーグ・ドーリー(Sprague Dawley)、7週令)の十二指腸に投与した。

投与0、1、2、4、6、10および24時間後ラットの尾静脈から採血し、血漿中のSOD活性を測定した。結果を表2図に示す。

すべての採血時において、—○—で示したPEG-SOD投与ラットの血漿中のSODレベルは、—△—で示したSOD投与ラットのそれらよりも高かった。なお図中、各点はPEG-SODについてはラット5匹の、SODについてはラット

実施例1で得られたPEG-SOD(原SODとして20 μ gとなる量)を、A/Jマウス(一群8匹)に静脈注射し、1、3および5週間後にSOD20 μ gとフロイント完全アジュバント(Freund's complete adjuvant)(FCA)との乳化物を腹腔内に投与した。結果を表1図に—○—として示す。第1図から明らかな如く、当初にPEG-SODを投与しておくと、その後SODを投与してもSODに対するIgE抗体は全く産生されなかった(注: IgE:イムノグロブリンE.)。

一方、対照として、SOD20 μ gをA/Jマウス(一群8匹)に静脈注射し、1、3および5週間後にSOD20 μ gとFCAとの乳化物を腹腔内投与した。結果を表1図に—△—として示した。第1図から明らかな如く、当初にSODを投与すると、SODに対するIgE抗体の産生はみられた。

なお、SODに対するIgE抗体量は、実験例2と同様の方法で、ラットを用いて投与4時間後のPCA反応で測定した。また、第1図に—●—として示されるデータは、上記と同様の方法におい

3匹の平均値を標準誤差とともに示した。

発明の効果

本発明のポリエチレングリコールで修飾されたSODは、抗炎症作用が増大され、免疫原性がほとんどなく、しかも血中半減期が長いので、抗炎症剤として有利に使用できる。

1. 図面の簡単な説明

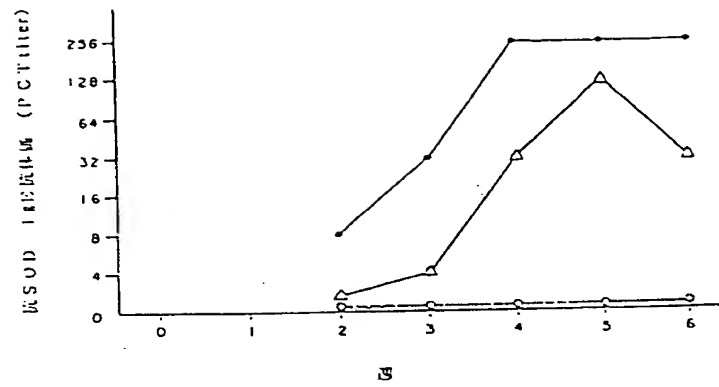
第1図は、実験例6で得られた免疫寛容誘導の結果を示す。

第2図は、実験例7で得られたラットにおける十二指腸投与後の血漿中の経時的SOD活性を示す。

代理人 弁理士 岩 田



第 1 図



第 2 図

